

西藏大花红景天 *RcCATs* 与 *RcSODs* 基因克隆及功能分析

王宏鹏, 李一丹, 滕彦娇, 陈成彬, 张力鹏^{1*}

(南开大学 生命科学学院, 天津 300071)

摘要: 为探究过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 基因家族成员在西藏大花红景天高原恶劣生境适应性中的作用, 利用生物信息学和实时荧光定量 PCR 技术对其 *RcCATs* 和 *RcSODs* 基因家族成员的序列和表达模式进行了分析, 并构建 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 的 pYES2.0 表达载体与 pGBKT7 诱饵载体, 分别进行了酵母胁迫分析和拟南芥酵母文库中互作蛋白的筛选。结果显示: (1) 大花红景天中共有 2 条 *RcCAT* 基因, 3 条 *RcSOD* 基因和 1 条 Cu/Zn SOD 铜伴侣基因 *RcCCS*。生物信息学分析显示上述基因的氨基酸序列与其同源基因具有较高的相似性 (66.37%~94.51%), 且均没有跨膜结构域, *RcCATs* 位于过氧化物酶体, *RcSODs* 和 *RcCCS* 位于细胞质或线粒体。(2) qRT-PCR 结果显示 6 个基因在根、茎、叶三个器官中均有表达且主要在叶片中表达, 低温胁迫和植物激素 ABA 对基因表达量的影响显著。(3) 酵母胁迫结果显示异源表达 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 基因的阳性酵母菌株在冷、热、盐、碱、重金属和 H₂O₂ 胁迫下的细胞活力均比 pYES2.0 空载菌株高。(4) 通过酵母双杂交共筛选到 4 个与 *RcCAT* 互作明显的基因 *AtbHLH121* (AT3G19860)、*AtCPC2* (AT2G23070)、*AtGRP4* (AT5G50750) 和 *AtRAPTOR1B* (AT3G08850), 3 个与 *RcSOD1* 互作明显的基因 *AtEMB* (AT5G11890)、*AtMBP2* (AT1G52030) 和 *AtRH8* (AT4G00660)。以上结果表明, 大花红景天能够通过 *RcCATs* 和 *RcSODs* 基因广泛参与调控其生长发育、胁迫响应等代谢途径来适应高原恶劣的环境。

关键词: 大花红景天, 过氧化氢酶, 超氧化物歧化酶, 生物信息学, 表达模式, 互作蛋白

Cloning and function analysis of *RcCATs* and *RcSODs* genes in Tibet *Rhodiola crenulata*

WANG Hongpeng, LI Yidan, TENG Yanjiao, CHEN Chengbin, ZHANG Lipeng^{*}

(College of life sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: In order to explore the role of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in plateau environment adaptation of Tibet *Rhodiola crenulata*, the *RcCATs* gene family members and *RcSODs* gene family members were analyzed by bioinformatics and real-time quantitative PCR. Spot assay was conducted to study the responses of yeast cells expressing the *RcCAT* and *RcSOD1* genes under abiotic stress. Yeast two-hybrid was conducted to screen interacting proteins from Arabidopsis yeast library respectively by constructing bait vectors of *RcCAT* and *RcSOD1*. The results were as follows: (1) There were two CAT genes, three SOD genes, and Cu/Zn SOD copper chaperone gene (*RcCCS*), six genes held high sequence identity (66.37%~94.51%) with other homologous species. All genes had no transmembrane domain and held multiple phosphorylation amino acids. Subcellular localization predicted that *RcCATs* located in peroxisoma, *RcSODs* and *RcCCS* located in cytoplasm or Mitochondria. (2) qRT-PCR analysis

基金项目: 国家自然科学基金 (31371682) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371682)].

作者简介: 王宏鹏 (1994-), 硕士研究生, 研究方向为分子细胞遗传学, (E-mail) wangh_p@163.com.

通信作者: 张力鹏, 博士, 助理研究员, 研究方向为分子细胞遗传学, (E-mail) nknanhai@163.com.

showed that *RcCATs* and *RcSODs* were constitutively expressed in three organs like root, stem and leaf and held the high expression levels in leaf, and all genes expression levels could also be regulated by low temperature and plant hormones (ABA). *RcCAT* was significantly up-regulated under cold treatment condition with the highest expression in leaf more than two times higher than root. *RcCAT*, *RcSOD2*, *RcSOD3* and *RcCCS* expression patterns were similar under ABA treatment condition. (3) In addition, spot assay showed that the recombinant *RcCAT* and *RcSOD1* yeast cells showed a higher cell viability than the pYES2.0 yeast cells in under cold, hot, NaCl, Na₂CO₃, Co²⁺, and H₂O₂. (4) The pGBKT7-*RcCAT* and pGBKT7-*RcSOD1* bait plasmid without toxicity and auto-activation were constructed to perform yeast two-hybrid screening, then four significant interactional genes with *RcCAT* were screened, which were *AtbHLH121* (AT3G19860), *AtCPC2* (AT2G23070), *AtGRP4* (AT5G50750) and *AtRAPTOR1B* (AT3G08850). Total three significant interactional genes with *RcSOD1* were screened, which were *AtEMB* (AT5G11890), *AtMBP2* (AT1G52030) and *AtRH8* (AT4G00660). These results illustrated that *RcCATs* and *RcSODs* could play an important role in regulating growth and promoting resistance to environmental stresses in Tibet *Rhodiola crenulata*, and laid the foundation for in-depth study of the adaptive mechanism of *Rhodiola crenulata* with plateau environment.

Key words: *Rhodiola crenulata*, catalase, superoxide dismutase, bioinformation, expression pattern, interaction proteins

大花红景天 (*Rhodiola crenulata*) 是一种多年生草本植物, 为景天科红景天属, 主要分布于我国的青藏高原及其毗邻一带, 包括西藏, 云南, 四川等地。中国药典记载大花红景天干燥根及根茎中含有多种活性成分, 如红景天苷, 酪醇及其衍生物, 具有益气活血, 通脉平喘的功能 (Pharmacopoeia, 2010)。现代生物医学研究证明, 大花红景天根部浸出液能够保护神经, 治疗抑郁, 焦虑, 癌症等多种疾病 (Qu et al., 2012; Yuan et al., 2020)。但是其生长环境较为严酷, 主要分布于海拔 3 500~5 000 m 的山坡草地、大块石灰岩的缝隙中, 因这些地带常伴有寒冷, 低氧, 强紫外照射等环境特点, 使得大花红景天的采集和研究应用都十分困难 (Fu et al., 2017)。目前分子生物学研究多集中于大花红景天活性成分及其种质资源多样性研究, 关于其生境适应性的分子机制, 尚缺乏丰富的报道 (Ma et al., 2007; Gyorgy et al., 2009)。

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是一类广泛存在于植物体内的小分子, 包括超氧阴离子 (O₂⁻)、羟自由基 (·OH)、过氧化氢 (H₂O₂) 等。ROS 对植物的影响是双向的, 取决于它在植物体内的浓度 (张梦如等, 2014)。在正常生长条件下, ROS 可经光合作用和呼吸作用中电子传递链产生。当植物受到干旱, 冷, 热, 强光, 病害等外界环境压力时会诱发产生大量 ROS (Suzuki et al., 2012; Munne-Bosch et al., 2013)。过量 ROS 会引起蛋白质, 脂质, 核酸等大分子损伤, 改变生物膜流动性, 诱发细胞程序性死亡 (Gisele et al., 2014; 张晓宇等, 2020)。因此植物细胞需严格控制 ROS 的含量以使其在复杂多变的环境中生存下来 (D'Autréaux & Toledano, 2006)。过氧化氢酶 (catalase, CAT) 是维持 H₂O₂ 平衡、参与氧化还原反应和离子结合等过程的重要酶 (Scott et al., 1999), 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 是一种能够清除 O₂⁻ 的抗氧化金属酶, 包括 Cu/Zn SOD、Mn SOD、Fe SOD 和 Ni SOD 四种类型 (马伟荣等, 2013)。研究表明, CAT 和 SOD 基因广泛参与植物对冷害、盐害、重金属毒害、病原菌等胁迫的应答以维持体内 ROS 含量的动态平衡。如羊茅在受到冷和高盐胁迫时, 其叶片中 *FaCat1* 基因表达量显著增加 (杨文龙等, 2006)。矮牵牛中过表达紫花苜蓿 Cu/Zn-SOD 基因, 能够有效提高其耐冷性 (平璐, 2016)。水稻中过表达 *OsCu/Zn-SOD* 基因后, 转基因植株的活性氧清除能力提高, 耐盐性增强 (廖栩, 2019)。柑

橘 *CsKat01* 基因通过调控 CAT 酶活, 改变 H_2O_2 含量进而影响柑橘对溃疡病的抗性(祁静静等, 2020)。目前已鉴定出多个物种的 CATs 和 SODs。例如, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中鉴定出了 3 个 CAT 和 7 个 SOD 基因家族成员(Kliebenstein et al., 1998; Vandenabeele et al., 2004), 水稻 (*Oryza sativa*) (Nath et al., 2014) 和高粱 (*Sorghum bicolor*) (FİLİZ & TOMBULOĞLU, 2015) 中均鉴定出 8 个 SOD 基因家族成员。鉴于大花红景天所生长的环境为极地高原气候, 在其生活史中寒冷、低氧、强紫外线照射等恶劣环境因子必然引起光合作用、呼吸作用及其他代谢途径的变化, 其中较为直接的影响即为活性氧的动态变化。因此, 我们提出 CAT 和 SOD 基因可能对于西藏大花红景天适应特殊生境具有重要的作用。然而, 目前对大花红景天及其红景天属植物尚没有相关基因的研究。

为了进一步研究 *RcCATs* 和 *RcSODs* 基因家族的功能, 本研究以西藏大花红景天为材料, 对 ROS 途径中的 CAT 和 SOD 基因家族成员进行克隆, 基于在线软件和实时定量 PCR 对其生物信息学和特异性表达进行分析, 并构建 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 的酵母表达载体与酵母双杂交诱饵载体, 分别进行酵母胁迫分析和筛选拟南芥酵母文库中的互作蛋白, 以揭示西藏大花红景天对其高原恶劣环境适应的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

研究材料为西藏大花红景天, 于 2015 年 7 月采集自西藏地区米拉山脉(海拔 4 868.4 m、92.34° E、29.78° N)。经南开大学宋文芹教授鉴定为景天科药用植物大花红景天。部分材料经液氮速冻后保存于 -80 °C; 其余材料以叶片为外植体进行组织培养获得无菌再生苗并进行后续实验。

1.2 实验方法

1.2.1 基因序列扩增

RcCATs、*RcSODs* 和 *RcCCS* 基因序列来源于本实验室已完成的转录组数据库, 基于 *de novo* 拼接的 unigene 注释信息, 分别以 CAT 和 SOD 为关键词对数据库进行检索, 获得 *RcCATs*、*RcSODs* 和 *RcCCS* 序列, 然后根据所获得的基因序列设计特异性引物扩增全长, 以大花红景天叶片 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后与 pMD19-T vector 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在氨苄抗性平板上进行筛选, 经菌液 PCR 和电泳检测后, 挑选阳性克隆送上海生工测序。

1.2.2 总 RNA 提取与 cDNA 第一条链的合成

总 RNA 提取依照改良 CTAB-异丙醇法进行(张力鹏等, 2017)。利用可见分光光度计 NanoDrop 1 000 检测 RNA 的纯度和浓度, 并利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。cDNA 第一条的合成利用反转录酶 M-MLV (Takara, Japan), 采用 50 μ L 体系, 反转录总 RNA 量为 5 μ g RNA。将反转产物用无菌 dd H_2O 稀释 10 倍后 -20 °C 保存。

1.2.3 生物信息学分析

通过生物信息学在线网站对获得的 *RcCATs*、*RcSODs* 和 *RcCCS* 基因氨基酸序列进行分析。利用 blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blastx>) 进行序列验证; 利用 ORF Finder (http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html) 获得编码框; 利用 blastp 寻找同源基因 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>); 利用 DNAMAN 计算 *RcCATs*、*RcSODs* 和 *RcCCS* 与各自同源基因的同源性比值; 利用 ProtComp 分析基因的亚细胞位置(<http://linux1.softberry.com/>); 利用 TMHMM Server, v. 2.0 分析基因的跨膜结构域有无 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); 利用 ExPASy 预测蛋白质理化性质 (<https://web.expasy.org/protparam/>) (张世鑫等, 2021; 解盛等, 2021)。

1.2.4 基因表达分析

组织特异性表达分析, 采用同一株组培苗的根, 茎, 叶三个器官。非生物胁迫采用低温诱导, 将处于同一生长时期的组培苗浸于冰水混合物中黑暗胁迫处理 0、3 和 7 d。植物激素脱落酸 (ABA) 诱导, 将同一生长时期的组培苗浸于含有 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 的 MS 液体培养基中, 黑暗处理 6、24、36 h, 每个处理均为 3 个生物学重复。胁迫处理后, 所有材料均经无菌水洗净并擦干后于液氮速冻, -80°C 超低温保存。胁迫处理材料的叶片用于提取总 RNA (张力鹏等, 2019)。

1.2.5 实时定量 PCR

采用 Bio-Rad 公司荧光定量 PCR 仪 iQ5 进行 qRT-PCR, 检测目的基因在不同组织和不同胁迫条件下表达水平。反应体系为 $20 \mu\text{L}$, 包含 $10 \mu\text{L}$ SYBRGreen (Takara, Japan), $1 \mu\text{L}$ cDNA, $0.5 \mu\text{L}$ 上下游引物。以 *RcGAPDH* 为内参基因, 每个样品均采用三次生物学重复 (Zhang et al., 2018)。

1.2.6 酵母表达载体构建和胁迫分析

利用无缝克隆法构建大花红景天 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 的 pYES2.0 表达载体, 大肠杆菌阳性克隆经菌液 PCR 和 Sanger 测序验证。将空载质粒、重组载体质粒按照 LiTE/PEG 法转入酿酒酵母 INVSCI 中。分别挑取 INVSCI (pYES2.0、pYES2.0-*RcCAT*、pYES2.0-*RcSOD1*) 单克隆于 20 mL 含 2% 葡萄糖的 SC/-Ura 液体培养基中, $30^\circ\text{C}/180 \text{ rpm}$ 培养至 $\text{OD}_{600}=0.5-0.8$ 之间。收集菌体重悬于含 2% 半乳糖的 SC/-Ura 液体培养基中, 调整 $\text{OD}_{600}=2.0$, $30^\circ\text{C}/180 \text{ rpm}$ 诱导 24 h。将诱导后的阳性菌株按照 10 倍梯度稀释, 取 $6 \mu\text{L}$ 分别滴于不同 YPDA 平板中进行胁迫处理。胁迫条件为热胁迫: 37°C 处理 1 d; 冷胁迫: -20°C 处理 6 h; 过氧化氢胁迫: YPDA 平板中加入 0.8 、 1.6 、 $3.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 ; 盐胁迫: YPDA 平板中加入 200 、 400 、 $600 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl ; 重金属和碱胁迫: 平板中加入 5 、 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 或 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 。将上述平板倒置于 30°C 培养箱中培养 3 d 后拍照 (Wang et al., 2008)。

1.2.7 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 自激活鉴定与互作蛋白筛选

酵母双杂交筛选拟南芥文库依 Clontech 公司 Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual 说明书进行。构建 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 基因的诱饵载体, 通过 LiTE/PEG 法转化 Y2H Gold 菌株。经菌液 PCR 验证阳性菌并进行自激活和毒性验证, 以排除基因本身对杂交结果的影响。然后进行文库筛选, 将诱饵载体与文库混合后涂布于 SD/-Trp-Leu-His+ β -gal 培养基进行初筛, 挑选蓝斑菌落摇菌提取质粒。利用 T7/3'AD 进行扩增和测序, 根据测序结果确定基因。最后, 将比对后的阳性克隆, 正对照 pGBKT7-53+pGADT7-T, 负对照 pGBKT7-*RcCAT*(*RcSOD1*)+pGADT7 分别滴于 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His 和 SD/-Trp-Leu+ β -gal 培养基, 30°C 培养 3 d 后拍照 (Zhang et al., 2018)。

2 结果与分析

2.1 大花红景天 *RcCATs* 和 *RcSODs* 基因的鉴定与克隆

因大花红景天没有参考基因组信息, 同时 NCBI 网站公布的有关红景天属基因序列多为 DNA 条形码。因此为解决其基因序列的缺乏, 本实验室对西藏大花红景天进行转录组测序。通过 *de novo* 拼接技术获得 unigenes 序列并进行功能注释。最终得到 2 条编码过氧化氢酶 CAT 的基因分别命名为 *RcCAT* 和 *RcCAT1*, 得到 3 条编码超氧化物歧化酶 SOD 的基因分别命名为 *RcSOD1*、*RcSOD2*、*RcSOD3*, 1 条编码超氧化物歧化酶的铜伴侣的基因 *RcCCS*。

根据各基因 unigenes 序列分别设计引物, 以大花红景天叶片 cDNA 为模板进行扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1。由结果可知 *RcCAT* 和 *RcCAT1* 基因长度均为 1479 bp, 编码 492 个氨基酸, 分子量稍有不同, *RcCAT* 为 56701.04 道尔顿, *RcCAT1* 为 56818.29 道尔顿。*RcSOD1* 和 *RcSOD2* 基因编码 Cu/Zn SOD, 核苷酸大小为 471/669 bp,

编码 156/222 个氨基酸，分子量为 16070.12/21870.7 道尔顿；*RcSOD3* 基因编码 Fe SOD，核苷酸数量为 804 bp，可编码 267 个氨基酸，蛋白质分子量为 30816.31 道尔顿。*RcCCS* 基因大小为 1 008 bp，编码 335 个氨基酸。

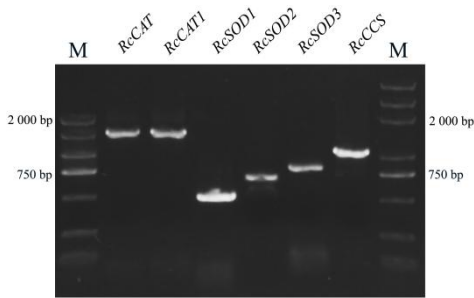


图 1 大花红景天 CAT、SOD、CCS 基因 PCR 扩增电泳图

Fig.1 PCR amplification electrophoresis result of CAT, SOD, CCS gene of *Rhodiola crenulata*

2.2 大花红景天 *RcCATs*、*RcSODs* 和 *RcCCS* 基因生物信息学分析

对大花红景天 *RcCATs*、*RcSODs* 和 *RcCCS* 基因的氨基酸序列进行分析，通过在线 BlastP 比对，获得 NCBI 数据库中的同源基因，利用 DNAMAN 计算各自基因与其同源基因的序列相似度，并利用多个在线网站基于其氨基酸序列进行分析。结果显示，6 个基因与其同源基因的序列一致性在 60%以上，以 *RcCAT* 基因最高为 95.51%，*RcCCS* 基因最低 66.37%，各自同源基因均为双子叶植物，且尚未下载到景天科红景天属的相关序列。蛋白质理化性质分析结果显示 *RcCAT1* 和 *RcSOD3* 蛋白质的等电点高于 7.0，其余 4 个基因为酸性蛋白质并以 *RcCCS* 的等电点最低为 5.7。脂溶指数均在 70%以上，其中 *RcSOD1*、*RcSOD2* 较高分别为 91.86 和 88.93，说明其为明显的脂溶性蛋白。总平均亲水性除 *RcSOD2* (0.085) 外，其他均为负值，说明具有一定的亲水性。此外，对跨膜结构域和其发挥生物学功能的主要亚细胞位置进行分析，结果显示 6 个基因均没有跨膜结构域，*RcCATs* 定位于过氧化物酶体，*RcSOD1*、*RcSOD2* 定位于细胞质，*RcSOD3* 和 *RcCCS* 定位于线粒体。蛋白激酶磷酸化位点预测结果显示 6 个基因均具有可磷酸化氨基酸位点，说明可能受到蛋白磷酸激酶的调控（表 1）。利用 MEGA7.0 构建 *RcCATs* 和 *RcSODs* 的 N-J 进化树，结果显示 *RcCAT* 基因与雷蒙德氏棉 (*Gossypium raimondii*) 的遗传距离最近，而 *RcCAT1* 与所列物种的 CAT 基因遗传距离较远。*RcSOD1* 与猕猴桃 (*Actinidia chinensis*) 最近，*RcSOD2* 与甜瓜 (*Cucumis melo*) 最近，*RcSOD3* 与笋瓜 (*Cucurbita maxima*)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 遗传距离最近，见图 2。

表 1 大花红景天 *RcCATs*、*RcSODs* 和 *RcCCS* 基因序列信息

Table 1 *RcCATs*, *RcSODs* and *RcCCS* genes information in *Rhodiola crenulata*

基因名 Gene name	<i>RcCAT</i>	<i>RcCAT1</i>	<i>RcSOD1</i>	<i>RcSOD2</i>	<i>RcSOD3</i>	<i>RcCCS</i>
ORF 长度 ORF length	1479 bp	1479 bp	471 bp	669 bp	804 bp	1008 bp
同源物种 Homologous species	<i>Macleaya cordatai</i>	<i>Sesamum indicum</i>	<i>Actinidia chinensis</i>	<i>Sedum alfredii</i>	<i>Cucurbita maxima</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>
同源基因 Homologous gene	OVA00608.1	NP_001291326.1	PSS36275.1	AIH25434.1	XP_022990032.1	XP_010055575.1
一致性 Identity	94.51%	80.89%	82.05%	84.19%	70.22%	66.37%
分子量	56 701.04	56 818.39	16 070.12	21 870.7	30 816.31	35 456.2

Molecular weight (D)						
等电点						
Isoelectric point	6.8	7.35	6.74	6.23	8.83	5.7
脂溶指数						
Aliphatic index	71.32	74.49	91.86	88.93	76.33	84.69
平均亲水性						
Average hydrophilic value	-0.561	-0.541	-0.201	0.085	-0.416	-0.042
磷酸化位点						
Phosphorylation site	39	43	5	17	23	52
亚细胞定位						
Subcellular localization	Peroxisoma	Peroxisoma	Cytoplasm	Cytoplasm	Mitochondria	Mitochondria
跨膜结构域						
Transmembrane domain	No	No	No	No	No	No

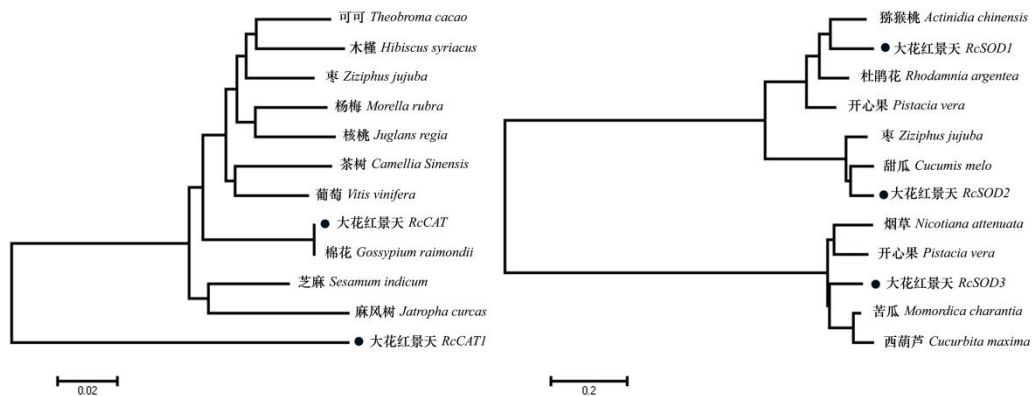
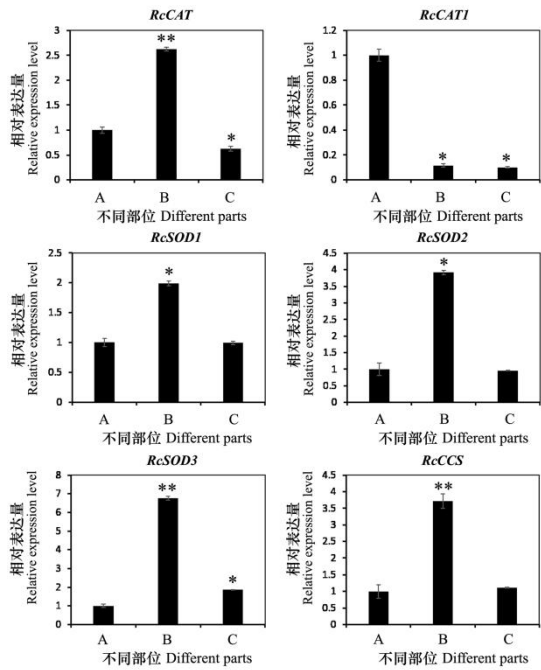


图 2 RcCATs 和 RcSODs 基因的 N-J 进化树

Fig.2 N-J phylogenetic tree of RcCATs and RcSODs

2.3 RcCATs、RcSODs 和 RcCCS 基因组织特异性表达模式

因不同基因发挥其分子功能的部位不同，基因常具有组织器官表达特异性。利用实时定量 PCR 方法检测 RcCATs、RcSODs 和 RcCCS 基因的 mRNA 在三个组织部位（根、茎、叶）的表达水平，可进一步了解各基因在大花红景天生长周期内所扮演的角色。结果显示 RcCATs 基因的两个成员在不同组织的表达水平差异很大，相比于根组织，RcCAT 在叶片中表达量最高呈 2.5 倍的显著差异，茎中的表达稍低，约为 0.6 左右；而 RcCAT1 在叶片和茎中表达均较低，仅为根中的 1/5。RcSODs 基因的的表达模式十分相似，即在根与茎中表达量相近而远低于叶中的表达量，如 RcSOD1 在叶片中表达量是根茎中的 2 倍，RcSOD2 可达 4 倍左右；RcSOD3 基因在叶片中超表达是根的 6.7 倍，茎的 3.7 倍。RcCCS 基因的表达模式与 RcSOD2 相似，在叶片中高表达是根/茎组织的 3.5 倍左右，如图 3。



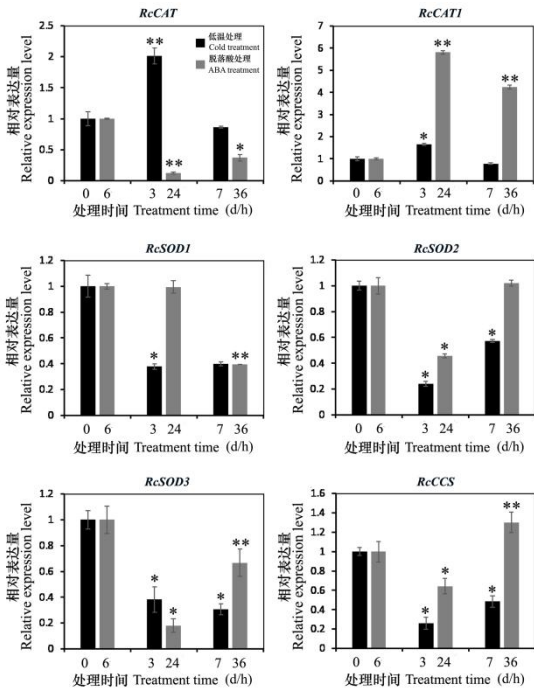
A. 根; B. 叶; C. 茎。*表示显著性差异 ($P<0.05$) ; **表示极显著性差异 ($P<0.01$) 。下同。
A. Root; B. Leaf; C. Stem. * indicates significant differences ($P<0.05$); ** indicates extremely significant differences ($P<0.01$). The same below.

图 3 大花红景天 *RcCATs*、*RcSODs* 和 *RcCCS* 基因组织特异性表达模式图
Fig.3 The figure of *RcCATs*, *RcSODs* and *RcCCS* tissue-specificity expression

2.4 冷胁迫与植物激素 ABA 诱导下 *RcCATs*、*RcSODs* 和 *RcCCS* 基因表达模式

大花红景天生长的环境恶劣，主要表现为温度较低，而低温会降低呼吸作用和光合速率，同时诱发产生大量活性氧，以阻碍植物的生长发育。因此对大花红景天组培苗进行了低温胁迫处理，以进一步分析 *RcCATs*、*RcSODs* 和 *RcCCS* 基因在低温诱导下的表达模式变化。结果显示 *RcCATs* 基因随着胁迫时间的延长表现出明显的上调趋势，尤其是 *RcCAT* 的表达量较对照组提高 2 倍左右；相反 3 个 *RcSODs* 基因的表达量呈下降趋势，仅 *RcSOD2* 在胁迫第 7 d 时有微弱的上调趋势，且与 *RcCCS* 基因的表达模式一致。

植物内源激素脱落酸 (ABA) 作为一种广泛应答胁迫的信号，在调节植物体内平衡以及提高胁迫耐受性方面发挥重要的作用，因此本研究绘制了大花红景天 *RcCATs*、*RcSODs* 和 *RcCCS* 基因在不同 ABA 处理时间下的表达谱。结果显示 *RcCATs* 的两个成员表达变化完全不同，*RcCAT* 在胁迫 24 h 时下调表达相比于对照组下降 5 倍以上；*RcCAT1* 上调表达可达对照组的 6 倍左右。*RcSODs* 基因的 3 个成员中，*RcSOD1* 随 ABA 胁迫时间的延长而下调表达仅为对照组的 40%，*RcSOD2* 和 *RcSOD3* 表现出先下调后上调的趋势。此外，*RcCCS* 基因的表达模式与 *RcSOD2* 一致，即 24 h 下调表达，36 h 上调表达，如图 4。



0. 低温处理 0 天; 3. 低温处理 3 天; 7 低温处理 7 天; 6. 脱落酸处理 6 小时; 24. 脱落酸处理 24 小时; 36 脱落酸处理 36 小时。
0. Low temperature treatment for 0 d; 3. Low temperature treatment for 3 d; 7. Low temperature treatment for 7 d; 6. Absciscic acid treatment for 6 h; 24. Absciscic acid treatment for 24 h; 36. Absciscic acid treatment for 36 h.

图 4 大花红景天 *RcCATs*、*RcSODs* 和 *RcCCS* 基因响应低温和 ABA 胁迫表达水平
Fig.4 Expression levels of *RcCATs*, *RcSODs* and *RcCCS* under cold and ABA treatment condition by qRT-PCR

2.5 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 的酵母异源表达与胁迫分析

为进一步分析 *RcCATs* 和 *RcSODs* 基因在调节大花红景天应对高原恶劣环境时的生理意义,我们分别构建了 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 的 pYES2.0 重组载体,并转入酿酒酵母菌株 INVSCI 中。如图 5 所示,在 6 种胁迫下,转 pYSE2.0 空载的酵母菌株生长的数量、菌斑大小和生命能力均不如 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 基因的阳性菌株。低温处理 6 h 后,空载菌株已失去了生活能力,而对 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 菌株影响较小;过氧化氢能够明显抑制酵母生长,空载菌株在 1.6 和 3.2 mol·L⁻¹ 时已基本失去了细胞活性,但异源表达 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 的菌株仍可在细胞浓度较高时具备一定的生命能力;对于不同浓度的盐胁迫而言,对空载菌株的影响非常大,而对 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 菌株影响较小;同样,重金属和 Na₂CO₃ 胁迫也对阳性菌株影响较低。

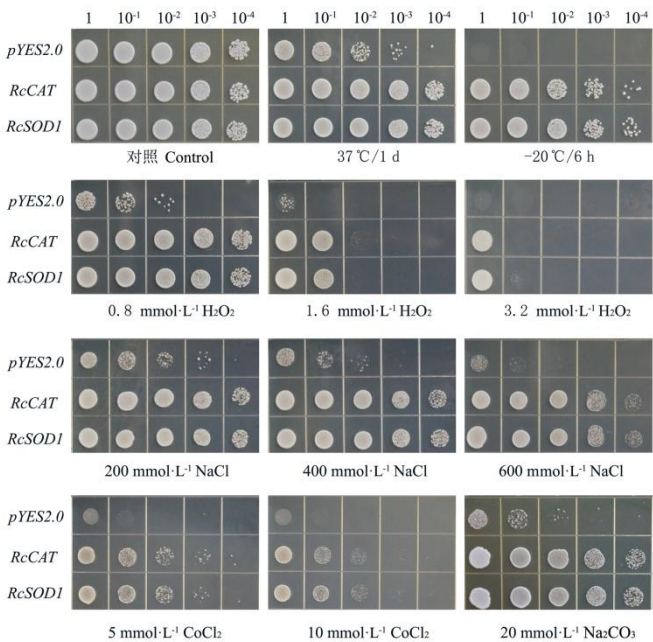


图 5 过表达 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 基因的酵母非生物胁迫诱导分析
Fig.5 Yeast abiotic stress induction analysis of *RcCAT* and *RcSOD1*

2.6 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 互作蛋白的筛选

为了进一步研究 *RcCATs* 和 *RcSODs* 基因的功能，分别对 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 基因进行克隆，并筛选拟南芥文库。首先验证其自激活活性和细胞毒性。如图 6 所示，转化 pGBKT7-*RcCAT* 和 pGBKT7-*RcSOD1* 的酵母细胞均在 SD/-Trp 培养基上能正常生长，但在 SD/-Trp-His 培养基上无法生长，负对照 pGBKT7 在 SD/-Trp-His 培养基上无法生长，正对照在 SD/-Trp-His 培养基上正常生长，表明 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 蛋白均没有自主激活活性和细胞毒性。

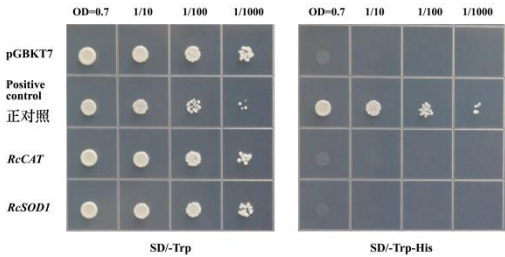


图 6 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 基因酵母自激活和毒性验证

Fig.6 Transcription activity and toxicity detection of *RcCAT* and *RcSOD1*

通过拟南芥酵母文库筛选和点对点滴板验证，筛选到了 4 个与 *RcCAT* 互作明显的基因，分别为 *AtbHLH*(AT3G19860)、*AtCPCK2*(AT2G23070)、*AtGRP4*(AT5G50750)和 *AtRAPTOR1B* (AT3G08850) 见图 7；3 个与 *RcSOD1* 互作明显的基因，分别是 *AtEMB* (AT5G11890)、*AtMBP2* (AT1G52030) 和 *AtRH8* (AT4G00660) 见图 8。拟南芥文库数据库收录的基因功能描述见表 2。

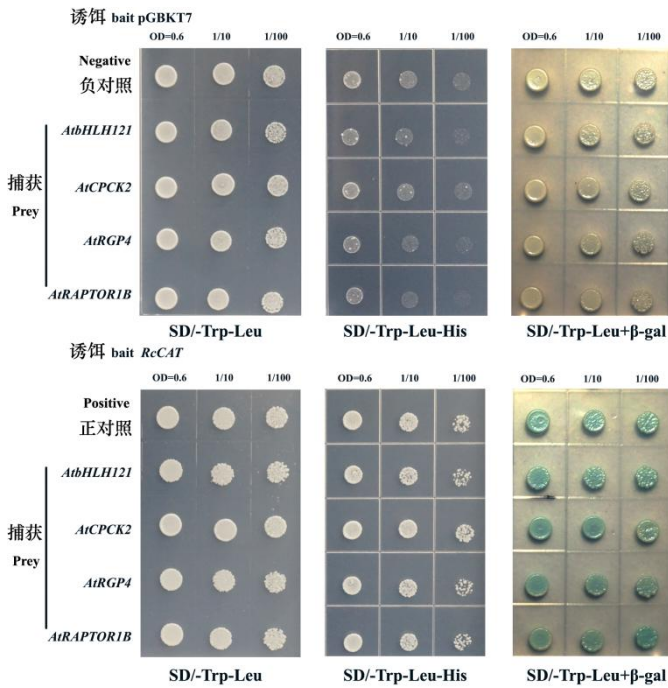


图 7 *RcCAT* 互作蛋白验证

Fig.7 Validation of interaction proteins for *RcCAT*

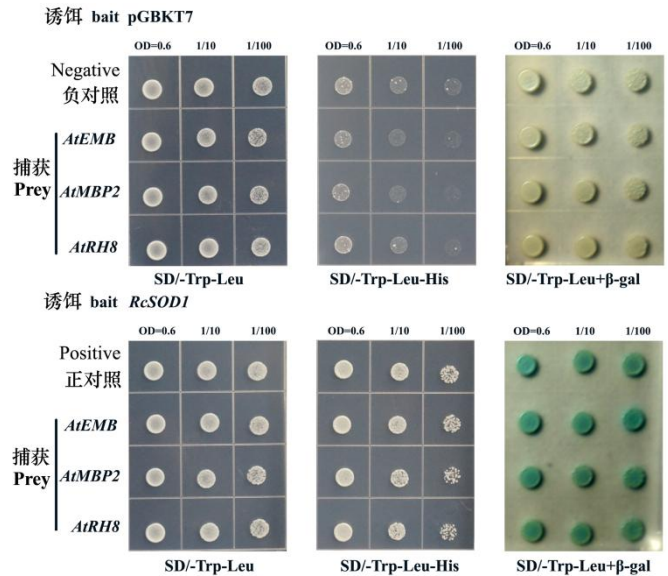


图 8 *RcSOD1* 互作蛋白验证

Fig.8 Validation of interaction proteins for *RcSOD1*

表 2 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 基因互作基因信息

Table 2 Interaction genes function information of *RcCAT* and *RcSOD1*

拟南芥基因号	基因大小	基因名	基因描述
<i>Arabidopsis</i> gene ID	Gene length	Gene name	Description

AT3G19860	1 014 bp	bHLH121	bHLH 转录因子是缺铁信号途径的重要组成部分。bHLH transcription factors are important components of the iron deficiency signaling pathway. (Lei et al., 2020).
AT2G23070	1 299 bp	CPC2	ABA 介导种子萌发，侧根发育和开花时间抑制的功能。Functions in ABA mediated suppression of seed germination, lateral root development and flowering time (Wang et al., 2014).
AT5G50750	1 095 bp	RGP4	RGP4 是可逆糖基化多肽。RGP4 is a reversibly glycosylated polypeptide (Rautengarten et al., 2011).
AT3G08850	4 035 bp	RAPTOR1B	在刺激细胞生长和响应营养物质代谢方面发挥重要作用。Plays a central role in the stimulation of cell growth and metabolism in response to nutrients (Salem et al., 2017).
AT5G11890	864 bp	EMB	胚胎缺陷 3135, harpin 诱导的蛋白质。EMBRYO DEFECTIVE 3135, harpin-induced protein.
AT1G52030	1 929 bp	MBP2	可能参与硫代葡萄糖苷代谢并形成防御化合物以防止食草动物进食。May be involved in metabolizing glucosinolates and forming defense compounds to protect against herbivory.
AT4G00660	1 518 bp	RH8	类 RNA 解旋酶-8。RNA helicase-like 8 (Huang et al., 2010).

3 讨论与结论

活性氧作为植物体内源分子，一方面在正常条件下可由光合作用和呼吸作用中电子传递链产生；另一方面当外界环境发生改变时会引起生物膜系统或电子传递链的损伤，从而诱发产生大量 ROS，对细胞造成氧化损伤，因此 ROS 作为信号分子可直接参与植物对胁迫的应答。本研究中，共分离了 ROS 清除途径中的 2 条 CAT 酶基因、3 条 SOD 酶基因和 1 条 SOD 铜伴侣基因。组织表达特异性分析和亚细胞定位预测结果表明 *RcCATs* 基因主要在叶片中大量表达，亚细胞位置定位于过氧化物酶体，并受到低温胁迫诱导大量表达，这与羊茅 *FaCAT1* 基因亚细胞定位于过氧化物酶体，其在冷处理的叶片中被显著诱导（杨文龙等, 2006）以及表达小麦 CAT 基因的水稻提高了对低温胁迫的应答（Matsumura et al., 2002）等研究结果相一致。同时，FaCAT1 是一种 i 型过氧化氢酶，有报道称 i 型过氧化氢酶在叶片中高度表达并参与清除光呼吸中 H₂O₂ 的去除（Willekens et al., 1995）。因此 *RcCATs* 基因可能共同参与了大花红景天光呼吸作用和对外界胁迫的应答。此外，*RcSOD2* 和 *RcCCS* 基因在组织表达特异性、低温或 ABA 胁迫诱导时的表达模式十分相近，推测 *RcCCS* 可能特异性将铜离子传递给 *RcSOD2*，将其激活生成有活性的酶分子（Yamasaki et al., 2009）。经同源序列比对，*RcSOD1* 和 *RcSOD2* 虽均编码 Cu/Zn SOD，*RcSOD3* 编码 Fe SOD，但 *RcSOD1* 在低温下的表达模式与 *RcSOD3* 相似，在 ABA 诱导下的表达模式与 *RcSOD2* 有所差异。刘家林等人报道的水稻 *OsSODs* 基因也存在类似的情况，即同一类型基因在同一逆境下的表达量也有所不同（刘家林等, 2018），说明 *RcSODs* 在大花红景天体内均可将超氧阴离子转变为过氧化氢，但存在功能上的冗余和分歧。

通过构建表达载体 pYES2.0, 将 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 基因异源过表达于酿酒酵母菌株 INVSCI 中, 并以空载质粒作为对照, 分析其在不同处理下细胞生长的水平, 结果可见 *RcCAT* 和 *RcSOD1* 均可应对冷、热、盐、碱、 H_2O_2 、重金属等胁迫压力, 班巧英等人将紫杆怪柳 MnSOD 基因转入酵母, 也提高了酵母抵抗盐、碱和紫外线胁迫的能力(班巧英等, 2008)。因此, 推测两个基因在大花红景天体内可能直接参与 ROS 分子的清除并协助其应对复杂的外界环境, 同时, 进一步证实了 CAT 和 SOD 基因能够广泛参与植物的非生物胁迫以维持体内 ROS 含量的平衡(陈金峰等, 2008; 刘家林等, 2018)。此外, 酵母双杂交也筛选到 *RcCAT* 基因的互作基因如 *AtbHLH121*, 该基因为 bHLH 类转录因子, 在铁元素缺乏时可引起磷酸化, 继而诱导 HLH38/39/100/101 基因表达, 这些转录因子反过来与 FIT 二聚化驱动 IRT1 和 FRO2 的基因的转录以增加铁的摄取(Lei et al., 2020)。另一互作基因 *AtCPCK2* 为质体酪蛋白激酶 2, 是叶绿体基质蛋白特异性 Ser/Thr 磷酸化酶, 其活性可受到氧化还原信号调控, 并可参与 ABA 调控拟南芥种子的萌发和幼苗的生长(Wang et al., 2014; Kim et al., 2016)。说明了 *RcCAT* 或 *RcSOD1* 也可通过蛋白质-蛋白质相互作用调节植物的生长代谢网络, 但其调控机理仍需进一步研究。

大花红景天的生长发育与抗逆基因的表达密切相关。本研究已对大花红景天 ROS 途径中 2 个关键基因 *RcCATs* 和 *RcSODs* 进行分离和分析。分析表明, 大花红景天的 *RcCATs* 和 *RcSODs* 基因家族在进化过程中发生了分化, 并广泛参与调控其生长发育、胁迫响应等代谢途径。这种发现有利于了解大花红景天应对高原恶劣环境的适应性, 在随后的研究中借助转基因技术对其生境适应性机制进行深入研究, 有望实现大花红景天的人工引种驯化和规模化、产业化种植, 同时提高研究人员对高原植物生长繁衍的认知。

参考文献

- BAN QY, LIU GF, JIANG J, et al., 2008, The roles of MnSOD from *Tamarix androssowii* in abiotic stress tolerance[J]. *Plant Physiol Comm*, 44(2): 211-214. [班巧英, 刘桂丰, 姜静, 等, 2008. 紫杆怪柳 MnSOD 基因在非生物胁迫中的作用[J]. *植物生理学通讯*, 44(2): 211-214.]
- CHEN JF, WANG GN, CHEN SM, 2008. Progress about catalase function in plant stress reactions[J]. *Acta Bota Boreal-Occident Sin*, (1): 188-193. [陈金峰, 王宫南, 程素满, 2008. 过氧化氢酶在植物胁迫响应中的功能研究进展[J]. *西北植物学报*, (1): 188-193.]
- D'AUTREAU B, TOLEDANO MB, 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10): 813-824.
- FİLİZ E, TOMBULOĞLU H, 2015. Genome-wide distribution of superoxide dismutase (SOD) gene families in *Sorghum bicolor*[J]. *Turkish J Biol*, 39: 49-59.
- FU Y, LI L, HAO S, et al., 2017. Draft genome sequence of the Tibetan medicinal herb *Rhodiola crenulata*[J]. *Gigascience*, 6(6): 1-5.
- GYORGY Z, JAAKOLA L, NEUBAUER P, et al., 2009. Isolation and genotype-dependent, organ-specific expression analysis of a *Rhodiola rosea* cDNA encoding tyrosine decarboxylase[J]. *J Plant Physiol*, 166(14): 1581-1586.
- HUANG TS, WEI T, LALIBERTÉ JF, et al., 2010. A host RNA helicase-like protein, *AtRH8*, interacts with the potyviral genome-linked protein, VPg, associates with the virus accumulation complex, and is essential for infection[J]. *J Plant Physiol*, 152(1): 255-266.
- JIE S, LI GQ, SONG LX, et al., 2021. Bioinformatics analysis of *Apocynum Venetum* CesA gene family[J]. *Guihaia*, 41(4): 522-534. [解盛, 李国旗, 宋立肖, 等, 2021. 罗布麻 CesA 基因家族的生物信息学分析[J]. *广西植物*, 41(4): 522-534.]

- KIM SY, BENDER KW, WALKER BJ, et al., 2016. The plastid casein kinase 2 phosphorylates rubisco activase at the Thr-78 site but is not essential for regulation of rubisco activation state[J]. *Frontiers in plant science*, 404(7): 1-24.
- KLIEBENSTEIN DJ, MONDE RA, LAST RL, 1998. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization[J]. *Plant Physiol*, 118: 637-650.
- LEI RH, LI Y, CAI YR, et al., 2020. bHLH121 functions as a direct link that facilitates the activation of *FIT* by bHLH IVc transcription factors for maintaining Fe homeostasis in *Arabidopsis*[J]. *Mol Plant*, 13(4): 634-649.
- LIAO X, 2019. Tolerance analysis of chloroplast *OsCu/Zn-SOD* overexpressing rice under NaCl and NaHCO₃ stress[D]. Harbin: Northeast Forestry University. [廖栩, 2019. 盐碱胁迫下过表达超氧化物歧化酶基因 *Os Cu/Zn-SOD* 水稻耐性分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学.]
- LIU JL, OYANG LJ, ZENG JL, et al., 2018. Genome-wide analysis of rice SOD gene family and expression research under stress[J]. *Mol Plant Breed*, 16(09): 2753-2760. [刘家林, 欧阳林娟, 曾嘉丽, 等, 2018. 水稻 SOD 基因家族的全基因组分析及逆境胁迫下表达研究[J]. 分子植物育种, 16(09): 2753-2760.]
- MA L Q, LIU B Y, GAO D Y, et al., 2007. Molecular cloning and overexpression of a novel UDP-glucosyltransferase elevating salidroside levels in *Rhodiola sachalinensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 26(7): 989-999.
- MA W.R, TONG JM, SHAN CH, 2013. The characteristics of superoxide dismutase and its research in plant resistance[J]. *The Food Ind*, 34(9): 154-158. [马伟荣, 童军茂, 单春会, 2013. 超氧化物歧化酶(SOD)的特征及在植物抗逆性方面的研究进展[J]. 食品工业, 34(9): 154-158.]
- MATSUMURA T, TABAYASHI N, KAMAGATA Y, et al., 2002. Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress[J]. *Plant Physiol*, 116(3): 317-327.
- MUNNÉ-BOSCH S, QUEVAL G, FOYER CH, et al., 2013. The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance[J]. *Plant Physiol*, 161(1): 5-19.
- NATH K, KUMAR S, POUDYAL RS, et al., 2014. Developmental stage-dependent differential gene expression of superoxide dismutase isoenzymes and their localization and physical interaction network in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Genes Genom*, 36: 45-55.
- PASSAIA G, QUEVAL G, BAI J, et al., 2014. The effects of redox controls mediated by glutathione peroxidases on root architecture in *Arabidopsis thaliana*[J]. *J Exp Bot*, 65(5): 1403-1413.
- Pharmacopoeia. pharmacopoeia of the people's republic of China [M]. Beijing: Chemical Industry Press. 2010.
- PING L, 2016. Over-expression of *Ms Cu/Zn-SOD* gene in *Petunia hybrida* and the cold tolerance analysis of transgenic plants[D]. Changchun: Jilin Agricultural University. [平璐, 2016. 紫花苜蓿 Cu/Zn-SOD 基因在矮牵牛中的表达及其耐冷性分析[D]. 长春: 吉林农业大学.]
- QI JJ, QIN XJ, XIE Y, et al., 2020. Correlation analysis of citrus catalase gene *CsKat01* and citrus canker disease[J]. *Acta Horti Sin*, 48(1): 26-36. [祁静静, 秦秀娟, 谢宇, 等, 2020. 过氧化氢酶基因 *CsKat01* 与柑橘溃疡病相关性分析[J]. 园艺学报, 48(1): 26-36.]
- QU ZQ, ZHOU Y, ZENG YS, et al., 2012. Protective effects of a *Rhodiola crenulata* extract and salidroside on hippocampal neurogenesis against streptozotocin-induced neural injury in the

- rat[J]. Plos One, 7(1): e29641.
- RAUTENGARTEN C, PETZOLD CJ, MUKHOPADHYAY A, et al., 2011. The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 23(4): 1379-1390.
- SCOTT LJ, RUSSELL GI, NIXON NB, et al., 1999. Oxidation of alpha1-proteinase inhibitor by the myeloperoxidase-hydrogen peroxidase system promotes binding to immunoglobulin A[J]. Biochem Biophysiol Res comm, 255(3): 562.
- SALEM MA, LI Y, WISZNIEWSKI A, et al., 2017. Regulatory-associated protein of TOR (RAPTOR) alters the hormonal and metabolic composition of *Arabidopsis* seeds, controlling seed morphology, viability and germination potential[J]. Plant J, 92(4): 525-545.
- SUZUKI N, KOUSSEVITZKY S, MITTLER R, et al., 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress[J]. Plant Cell Environ, 35(2): 259-270.
- VANDENABEELE S, VANDERAUWERA S, VUYLSTEKE M, et al., 2004. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J, 39(1): 45-58.
- WANG BF, WANG CY, ZHANG DW, et al., 2008. Verification of the resistance of a LEA gene from *Tamarix* expression in *Saccharomyces cerevisiae* to abiotic stresses[J]. J Forestry Res, 19(1): 58-62.
- WANG Y, CHANG H, HU S, et al., 2014. Plastid casein kinase 2 knockout reduces abscisic acid (ABA) sensitivity, thermotolerance, and expression of ABA and heat-stress-responsive nuclear genes[J]. J Exp Bot, 65(15): 4159-4175.
- WILLEKENS H, INZE D, VAN MONTAGU M, et al., 1995. Catalases in plants[J]. Mol Breed, 1(3): 207-228.
- YAMASAKI H, HAYASHI M, FUKAZAWA M, et al., 2009. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 21(1): 347-361.
- YANG WL, LIU JM, CHEN F, et al., 2006. Identification of *Festuca arundinacea* Schreb Cat1 catalase gene and analysis of its expression under abiotic stresses[J]. J Integr Plant Biol, 48(3): 334-340.
- YUAN C, JIN YQ, YAO L, et al., 2020. *Rhodiola crenulata* root extract ameliorates fructose-induced hepatic steatosis in rats: association with activating autophagy[J]. Biomed Pharmacotherapy, 125: 109836.
- ZHANG LP, HAN XY, CHENG LL, et al., 2019. Isolation and expression analysis of Cyp450 Genes in Tibet *Rhodiola renulata*[J]. N Hort, (18): 116-127. [张力鹏, 韩祥艳, 成璐路, 等, 2019. 西藏大花红景天 cyp450 基因的分离与表达分析[J]. 北方园艺, (18): 116-127.]
- ZHANG LP, WU M, TENG YJ, et al., 2018. Overexpression of the glutathione peroxidase 5 (RcGPX5) gene From *Rhodiola crenulata* Increases drought tolerance in *Salvia miltiorrhiza*[J]. Front Plant Sci, 9: 1950-1966.
- ZHANG LP, WU M, YU DS, et al., 2018. Identification of glutathione peroxidase (GPX) gene family in *Rhodiola crenulata* and gene expression analysis under stress conditions[J]. Int J Mol Sci, 19(11): 3329-3346.
- ZHAN LP, ZHANG YX, SONG WQ, et al., 2017. A highly efficient method of RNA extraction from *Rhodiola* plant[J]. Journal of Nankai University (Natural Science Edition), 50(6): 48-53. [张力鹏, 张银兴, 宋文芹, 等, 2017. 红景天属植物叶片 RNA 高效提取的方法[J]. 南

开大学学报：自然科学版，50(6): 48-53.]

ZHANG MR, YANG YM, CHENG WX, et al., 2014. Generation of reactive oxygen species and their functions and deleterious effects in plants[J]. Acta Bota Boreal-Occident Sin, 34(9): 1916-1926. [张梦如, 杨玉梅, 成蕴秀, 等, 2014. 植物活性氧的产生及其作用和危害[J]. 西北植物学报, 34(9): 1916-1926.]

ZHANG SX, WU SH, YANG SG, et al., 2021. Gene cloning and expression analysis of mediator *HbMed25* in *Hevea brasiliensis*[J]. Guihaia. DOI:10.11931/guihaia.gxzw202005041. [张世鑫, 吴绍华, 杨署光, 等, 2021. 巴西橡胶树转录中介体 *HbMed25* 基因克隆与表达分析[J/OL]. 广西植物. DOI:10.11931/guihaia.gxzw202005041.]

ZHANG XY, YANG H, ZHANG Y, et al., 2020. Effects of low temperature stress on physiological characteristics of *Melaleuca alternifolia* tissue culture seedlings[J]. Guihaia. DOI:10.11931/guihaia.gxzw202006020. [张晓宁, 杨红, 张烨, 等, 2020. 低温胁迫对澳洲茶树组培苗生理特性的影响[J]. 广西植物. DOI:10.11931/guihaia.gxzw202006020.]